

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 avril 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/27136 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C07K

(74) Mandataire: BREESE, Pierre; Breese-Majerowicz, 3,
avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02786

(22) Date de dépôt international: 6 octobre 2000 (06.10.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/12714 12 octobre 1999 (12.10.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): BAR-
RITAULT, Denis [FR/FR]; 4, rue Française, F-75001
Paris (FR). ACHOUR, Ammar [DZ/FR]; 14 bis, rue de
Mayenne, F-94000 Creteil (FR). COURT, José [FR/FR];
15, allée Verte, F-94440 Villecresnes (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: PEPTIDES WHICH STIMULATE THE IMMUNE RESPONSE AND TISSUE REGENERATION

(54) Titre: PEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE STIMULATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ET DE REGENERA-
TION TISSULAIRE

(57) Abstract: The invention relates to a peptide of formula (I): $(A)_n - A1 - A2 - A1 - A3 - A4 - A1 - (A)_m$, wherein A is any amino acid, n and m are each whole numbers from 0 to 20, the sum of which n + m is between 0 and 20, preferably between 0 and 15 and especially preferably between 0 and 10, A1 is a basic amino acid, especially lysine (Lys) or arginine (Arg), A2 is an amino acid selected from the following: basic amino acids, glutamic acid (Glu), glycine (Gly), aspartic acid (Asp); A3 is an amino acid selected from the following: basic amino acids, proline (Pro), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln); and A4 is an amino acid selected from the following: basic amino acids, glutamic acid (Glu), glycine (Gly), serine (Ser), valine (Val).

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte à un peptide répondant à la formule (I): $(A)_n - A1A1 - A2 - A1 - A3 - A4 - A1 - (A)_m$ dans laquelle: A est un acide aminé quelconque, n et m sont chacun des nombres entiers de 0 à 20 dont la somme n + m est comprise entre 0 et 20, de préférence entre 0 et 15 et tout préférentiellement entre 0 et 10, A1 est un acide aminé basique et plus particulièrement la lysine (Lys) ou l'arginine (Arg), A2 est un acide aminé choisi parmi: les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp), A3 est un acide aminé choisi parmi: les acides aminés basiques, la proline (Pro), l'acide glutamique (Glu), la glutamine (Gln), A4 est un acide aminé choisi parmi: les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), la sérine (Ser), la valine (Val).

WO 01/27136 A2

PEPTIDES AYANT UNE ACTIVITÉ DE STIMULATION
DE LA REPONSE IMMUNITAIRE ET DE RÉGÉNÉRATION TISSULAIRE.

La présente invention concerne une nouvelle
5 famille de molécules peptidiques ayant la capacité
notamment de stimuler l'expression des cytokines de
l'inflammation et de favoriser la régénération des
tissus. L'invention se rapporte donc également aux
compositions pharmaceutiques contenant au moins un des
10 peptides.

On connaît dans l'art antérieur de nombreux
facteurs de croissance angiogéniques comme les facteurs
HARP, MK, FGF-1, FGF-2, VEGF, HIV1-tat, HIV2-tat, HGF,
HB-EGF ou encore l'angiogenine. Parmi ceux-ci, HARP
15 (Heparin Affin Regulatory Peptide), aussi appelé PTN
(Pleiotrophin) ou encore HB-GAM (heparin binding-growth
associated molecule), constitue avec MK (Midkine) une
famille de ces facteurs de croissance/différenciation
structurellement apparentés qui se lient à l'héparine,
20 et présentent 50% d'homologie en acides aminés (1, 2).

Le facteur de croissance HARP est un
polypeptide de 168 acides aminés contenant un motif N-
terminal hydrophobe de 32 acides aminés correspondant à
un peptide signal. Sous sa forme mature, HARP est une
25 protéine sécrétée de 136 acides aminés, dans sa forme
courte, ou 139 acides aminés, dans sa forme longue, dont
le poids moléculaire apparent, déterminé en SDS-PAGE en
conditions réductrices, est de 18 kDa.

Initialement HARP a été isolé à partir de
30 cerveaux de nouveau nés de rat comme une molécule
induisant *in vitro* une croissance neuritique (3)
suggérant que ce polypeptide est impliqué dans la
maturation des cellules neuronales (4). Plus tard, des
études ont montré que ce polypeptide était aussi présent
35 dans des tissus non-neuronaux, dont le cœur (5).

l'utérus (6), les cartilages (7), et les extraits d'os (8), démontrant que la fonction de HARP n'est pas limitée à une activité promotrice d'une croissance neuritique comme précédemment rapporté (3).

5

HARP est capable de stimuler la croissance de cellules fibroblastiques, épithéliales et endothéliales *in vitro* (6, 9). Cette activité mitogène a été depuis confirmée par l'utilisation de protéines recombinantes produites à partir de systèmes d'expression eucaryote (9, 12). HARP induit également *in vitro* la formation de pseudo-capillaires (12). *In vivo*, dans différents modèles tissulaires, la localisation de HARP est notamment associée aux cellules endothéliales des capillaires sanguins (16). A l'heure actuelle, les données concernant HARP suggèrent que ce polypeptide joue un rôle dans les mécanismes complexes impliqués dans l'angiogénèse et la néoangiogénèse tumorale. De nombreuses recherches ont été effectuées dans cette voie afin de déterminer l'implication de HARP dans la progression tumorale, notamment dans les tumeurs hormono-dépendantes comme le sein ou la prostate.

10
15
20

Des études relatives aux propriétés biologiques de HARP ont été effectuées par de nombreux laboratoires (2) et en dépit de résultats controversés, il apparaît admis que HARP, tout comme MK, est impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire (2, 9-11). De plus, il a été démontré que les protéines recombinantes purifiées humaines de HARP sont mitogéniques pour les cellules endothéliales (9,12), et exercent *in vitro* une activité angiogénique (12). De nombreuses études ont montré l'implication de HARP et MK dans des procédés de développement (10, 13, 14). Des études de distribution de l'ARNm de la protéine HARP pendant le développement embryonnaire et postnatal

25
30
35

suggèrent des fonctions importantes dans la croissance cellulaire et la différenciation (15). Toutefois, les fonctions physiologiques *in vivo* de ces molécules ne sont que très peu connues. La présence de transcripts de HARP dans les tissus adultes incluant les méninges, l'iris, les testicules et l'utérus indiquent aussi un rôle physiologique durant l'âge adulte.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont porté sur de nombreux facteurs de croissance angiogéniques, comme FGF-1, FGF-2, VEGF, HIV1-tat, HIV2-tat, HB-EGF, Angiogenin, HARP et MK, et ont permis aux inventeurs d'identifier des séquences peptidiques qui se retrouvent dans plusieurs de ces facteurs. A partir de celles-ci, les inventeurs ont construit des molécules peptidiques riches en acide aminés basiques lysine (K) et arginine (R).

Le tableau I ci-dessous rapporte des portions de séquences riches en acides aminés basiques de plusieurs facteurs de croissance où les positions des acides aminés basiques sont sensiblement alignées.

Tableau I

Facteur de croissance	Séquence
HARP (1-14)	GKKEKPEKKVKKSD
HIV-2-tat (70-92)	K-GLGICYERKGRRRRTPKKTK-TH
HB-EGF (85-114)	ATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK
HARP (108-132)	KLTKPKPQAESKKKKKEGKKQEKML
FGF-2 (116-141)	RSRKYTSWYVALKRTGOYKLGSKTGPGOP
HGF (25-50)	IAIPYAEGQRKRNTIHEFKKSAKTT
VEGF (145-170)	RGKGKGPKRKRKKSRYKSWSVPCGP
HIV1-tat (41-65)	KGLGISYGRKKRRQRRRPPOGNOAH
MK (106-122)	PKTKAKAKAKKGKG-KD
MK (1-11)	KKKDKVKKGGP
Angiogenine (24-50)	RYCESIMRRRGLTSPCKDINTFIN
FGF-1 (15-42)	KFNLPNGNYKKPKLLYCSNGGHFLRILP

FGF-1 (115-140)

KKHAEKNWFVGLKKN GSCCKRGPRTHYGOK

L'invention a donc pour objet un peptide répondant à la formule (I) suivante :



Dans laquelle :

. A est un acide aminé quelconque,

. n et m sont chacun des nombres entier de 0 à 20 dont la somme $n + m$ est comprise entre 0 et 20, de préférence entre 0 et 15 et tout préférentiellement entre 0 et 10,

. A1 est un acide aminé basique et plus particulièrement la lysine (Lys) ou l'arginine (Arg),

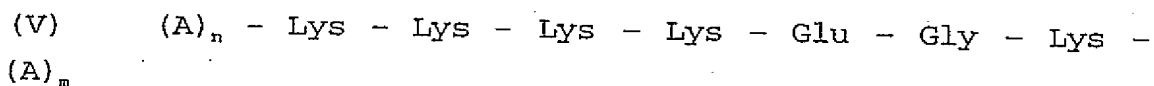
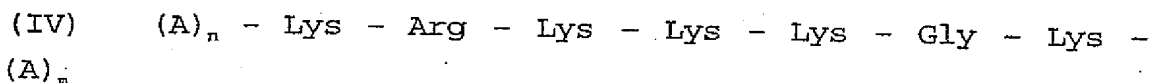
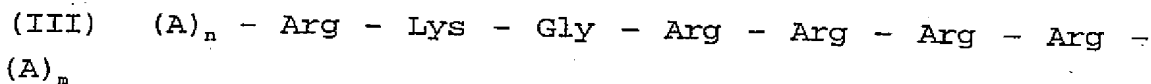
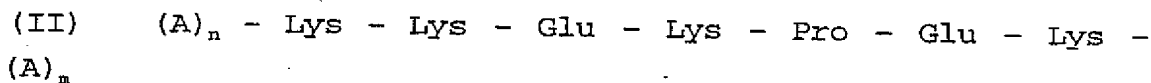
. A2 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp),

. A3 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, la proline (Pro), l'acide glutamique (Glu), la glutamine (Gln),

. A4 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), la sérine (Ser), la valine (Val).

Les peptides de formule (I) selon l'invention seront aussi désignés "pAHA" pour "peptide angiogénique de HARP".

L'invention envisage plus particulièrement, les peptides de formules suivantes :



(VI) $(A)_n$ - Arg - Lys - Arg - Lys - Lys - Ser - Arg - $(A)_m$

(VII) $(A)_n$ - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg - $(A)_m$

5 (VIII) $(A)_n$ - Lys - Lys - Asp - Lys - Val - Lys - Lys - $(A)_m$

dans lesquelles A, n et m ont la même signification que dans la formule (I).

10 Le peptide de formule (II) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de HARP (1-14).

Le peptide de formule (III) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de HIV tat (70-92).

15 Le peptide de formule (IV) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de HB-EGF (85-114).

Le peptide de formule (V) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de HARP (108-132).

20 Le peptide de formule (VI) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de VEGF (145-170).

25 Le peptide de formule (VII) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de HIV tat (41-65).

Le peptide de formule (VIII) a été défini plus particulièrement à partir de la séquence de MK (1-11).

30 Les peptides de l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique ou par des techniques d'expression génétique à partir de la séquence polynucléotidique correspondante par des techniques connues de l'homme du métier.

Les inventeurs ont mis en évidence que les peptides pAHA présentent des propriétés angiogéniques et cicatrisantes comme HARP et à des doses comparables (ED50# 5-50 ng/ml). Ils ont en effet observé l'activité remarquable de ces peptides sur l'ischémie vasculaire (angiogénèse) et la régénération musculaire et la cicatrisation. Ils ont aussi montré que les peptides de l'invention sont capables de stimuler l'expression des cytokines de l'inflammation et sont donc utiles pour prévenir ou traiter les maladies liées à l'immunodépression, et tout particulièrement le sida.

L'invention se rapporte donc également à une composition pharmaceutique contenant un ou plusieurs des peptides précédents, associés dans ladite composition avec un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables.

Compte tenu des propriétés des peptides décrits ci-dessus sur la régénération tissulaire, l'invention concerne tout particulièrement une composition comprenant un ou plusieurs peptides pAHA, et éventuellement un autre composé, utile pour favoriser la régénération et la croissance cellulaire, comme la croissance musculaire, et donc dans la cicatrisation.

Du fait des propriétés des peptides décrits ci-dessus sur l'angiogénèse, l'invention concerne tout particulièrement une composition comprenant un ou plusieurs peptides pAHA, et éventuellement un autre composé, utile pour prévenir ou traiter l'ischémie vasculaire.

Comme indiqué précédemment, les travaux de recherche effectués dans le cadre de l'invention, ont permis de mettre en évidence des propriétés inattendues des pAHA sur la prolifération des cellules circulantes du sang, et tout particulièrement des cellules mononucléées du sang périphérique. Une étude détaillée

de cette propriété a permis de montrer les propriétés stimulatrices de pAHA sur certaines cytokines, tout particulièrement les cytokines de l'inflammation.

5 Il a en effet été observé la présence d'ARNm de la protéine HARP dans les cellules des vaisseaux sanguins, à la fois des cellules endothéliales et des cellules des muscles lisses, ainsi que dans les glandes mammaires humaines (16). En outre, il a été rapporté que
10 HARP est un facteur de croissance angiogénique (12) et qu'il est synthétisé et localisé dans les cellules endothéliales vasculaires (16).

Les inventeurs ont donc évalué l'activité *in vitro* de ce facteur de croissance sur des PBMCs
15 (cellules mononucléées humaines du sang périphérique) fraîchement isolées en incubant des PBMCs avec le facteur HARP ou avec un peptide pAHA. Les résultats obtenus montrent que HARP et pAHA sont capables de stimuler l'incorporation de thymidine tritiée dans le
20 noyau des PBMCs. Ces résultats démontrent donc que la molécule HARP ainsi que le peptide pAHA stimulent fortement la prolifération des cellules mononucléées humaines du sang périphérique, et plus particulièrement après une semaine on observe une augmentation de la
25 population des lymphocytes T.

Les différentes expériences menées par les inventeurs ont montré que HARP est actif sur la prolifération des lymphocytes à des concentrations très faibles, de l'ordre de 10 pM. Ce résultat étonnant a
30 conduit les inventeurs à considérer que le facteur HARP doit se fixer à son récepteur sur les PBMCs avec une forte affinité.

Après incubation des PBMCs avec le facteur HARP, aucune augmentation du taux d'IL2 n'a été
35 observée. Les inventeurs ont donc conclu que HARP n'agit pas sur la production des interleukines IL2, mais que

HARP, et pAHA, se fixent avec une forte affinité à un récepteur spécifique présent sur les lymphocytes, et induisent l'activation des sites des interleukines, tout particulièrement des sites de IL2.

5 A ce jour, les récepteurs de HARP sont très peu connus. La présence de site de liaison de forte affinité ($K_d = 600\text{pM}$) avec HARP dans les cellules NIH 3T3 a déjà été rapporté (20). Ces sites de liaison de HARP ont aussi été retrouvés dans plusieurs types
10 cellulaires, incluant les cellules de rein de rats, cellules de l'adénocarcinome mammaire d'homme, cellules du carcinome épidermique d'homme, cellules de l'hépatocarcinome humain, neuroblastes de souris, et cellules du phéochromocytome.

15 Il est communément admis qu'aucune réponse biologique transmise par HARP n'a été observée sur ce type de cellules, et par conséquent que ces sites de fixation ne peuvent pas être considérés comme des récepteurs fonctionnels. Des études parallèles décrivent
20 les interactions entre HARP et les protéoglycane sulfate heparan, comme syndecan-1 et syndecan-3. Il a été montré que Syndecan-3 interagit avec HARP avec un K_d apparent de 800pM . Ce protéoglycane sulfate heparan est impliqué dans l'activité d'excroissance neuritique de HARP
25 puisque les anticorps anti-syndecan-3 peuvent bloquer cette activité (21).

Plus récemment, un rapport de Maeda et al. décrit la fixation de HARP avec des sites de fixation de faible ($K_d=3\text{nM}$) et de forte ($K_d=250\text{pM}$) affinité au
30 phosphacan, un variant extracellulaire d'un récepteur similaire une protéine tyrosine phosphatase β , RPTP β (22).

Dé façon intéressante, bien que MK (Midkine) et HARP appartiennent à la même famille de molécules, et
35 que les deux induisent une excroissance neuritique (17;

23), aucune induction d'incorporation de thymidine tritiée chez les PBMCs n'a été détectée en utilisant MK, suggérant que MK et HARP se fixent sur des récepteurs de surface différents, ce qui a d'ailleurs été récemment démontré (24, 25). De plus, les deux molécules sont exprimées et isolées en utilisant des méthodes expérimentales analogues, incluant le même système recombinant d'expression et les mêmes techniques de purification. Le fait que l'incorporation de thymidine tritiée s'observe uniquement avec HARP, et non avec MK exclut la présence d'un contaminant bactérien présentant une activité mitogène vis à vis des PBMCs.

Selon les donneurs de PBMCs, des indices différents de stimulation ont été observés. L'effet mitogénique induit par HARP le plus significatif est mieux observé en utilisant des cellules quiescentes, sans activation des PBMCs par des lectines, comme PHA préconisé pour l'activité mitogénique induite par IL2. Ce résultat confirme bien le fait que HARP n'induit pas une stimulation de la production d'IL2.

Les résultats obtenus montrent donc que le peptide pAHA agit sur la prolifération de cellules immunitaires, et plus spécifiquement sur les lymphocytes T. En conséquence, l'invention se rapporte plus particulièrement à une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs peptides pAHA, et éventuellement un autre composé, utile pour stimuler la prolifération des cellules mononucléées du sang, et tout particulièrement des lymphocytes T. La stimulation de la prolifération des cellules lymphocytaires T est tout particulièrement utile dans le traitement des malades immuno-supprimés.

Une autre observation a été faite sur des cellules provenant de sang de patients atteints de sida. Dans l'exemple 4 ci-après, les inventeurs montrent

comment la stimulation des cellules du sang du malade par les peptides de l'invention permet d'amplifier *in vitro* la réplication du virus HIV et ainsi de favoriser sa détection et donc son typage. Des compositions
5 comprenant des peptides de l'invention sont donc aussi utiles pour le diagnostic d'une infection par les virus HIV.

En matière de traitement d'une infection par les virus HIV, l'efficacité des agents anti-viraux sera
10 renforcée en les administrant préalablement ou simultanément avec un ou plusieurs peptides de l'invention. En effet, les peptides de l'invention vont favoriser la réplication et la libération des virus HIV *in vivo*, notamment des virus HIV résiduels, qui restent
15 présents dans l'organisme après un traitement anti-viral. L'administration des peptides selon l'invention, en activant ces virus, les rendrait ainsi plus accessibles aux agents antiviraux, et plus aisément destructibles.

Il est par ailleurs connu que, outre IL2, les cytokines de manière générale jouent un rôle sur la prolifération cellulaire, plus particulièrement des
20 cellules du sang. Les inventeurs ont donc cherché à mettre en évidence le rôle de HARP et de pAHA sur l'expression des cytokines. Il a ainsi été mis en
25 évidence des propriétés inductrices de l'expression des cytokines de l'inflammation. Par cytokines de l'inflammation il faut entendre préférentiellement TNFalpha, IL1, IL6, et INFgamma.

Les inventeurs ont donc testé l'induction de l'expression de trois cytokines de l'inflammation (TNFalpha, IL1 et IL6) par les cellules PBMCs traitées
30 par HARP, et l'induction de l'expression d'IL6 par deux peptides pAHA conformes à la présente invention dont les séquences sont rapportées dans l'exemple 5 ci-après. Les
35

résultats obtenus avec la molécule HARP indiquent que HARP est capable d'induire d'une façon dose dépendante l'expression des cytokines TNFalpha, IL1 et IL6.

Les résultats obtenus avec les deux peptides pAHA montrent qu'ils sont capables de stimuler l'expression d'IL6. Une augmentation de l'expression de ces cytokines est également détectée après adjonction aux cellules d'autres peptides conformes à la présente invention, issus de l'angiogenine et de la protéine tat (voir tableau I). Aucune expression de ces cytokines inflammatoires n'est détectée lorsque la molécule HARP est dénaturée.

Ces résultats montrent que HARP et pAHA ont *in vitro* et *in vivo* la capacité de stimuler plus de 100 fois la production de cytokines de l'inflammation. En conséquence, l'invention se rapporte tout particulièrement à une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs peptides pAHA, et éventuellement un autre composé, utile pour stimuler la production des cytokines de l'inflammation. Une telle composition selon l'invention est donc particulièrement indiquée dans la prévention ou le traitement des maladies liées à l'immunodépression.

Ces travaux ont montré que les tissus traités par HARP ou pAHA présentent un nombre de cellules mononucléées très important favorisant ainsi la régénération musculaire. Ces résultats combinés à ceux décrits précédemment concernant l'effet des peptides pAHA sur la régénération cellulaire et tissulaire, démontrent l'effet de HARP et de pAHA sur le régénération tissulaire, et plus particulièrement des tissus musculaires.

Ces résultats permettent en outre d'utiliser les peptides de l'invention ou une composition les contenant pour favoriser la croissance et la

différentiation de cellules en culture, notamment de
cellules lymphoïdes, comme des cellules endothéliales et
des lymphocytes T. En effet, la culture de ces cellules
est souvent pratiquée dans le cadre de tests de
diagnostic.

Comme indiqué précédemment les peptides de
l'invention peuvent être produit par expression
génétique d'une séquence polynucléotidique codant
lesdits peptides. L'invention a donc aussi pour objet
une molécule d'acide nucléique constituée par ou
comprenant au moins une séquence polynucléotidique
codant pour un peptide défini précédemment. De telles
molécules d'acide nucléique sont plus particulièrement
des vecteurs, comme des plasmides qui peuvent être
utilisés pour transformer des cellules hôtes *in vitro* ou
in vivo. On entend par cellules hôtes par exemples des
bactéries permettant la production des peptides de
l'invention. On entend aussi des cellules de mammifère
tout particulièrement humaine, utiles pour des méthodes
de thérapies cellulaires ou géniques des pathologies
décrites précédemment pour lesquelles les peptides de
l'invention sont utiles. L'invention a donc encore pour
objet des compositions comprenant comme principe actif
au moins une molécule d'acide nucléique ou des cellules
définies ci-dessus.

D'autres avantages et caractéristiques de
l'invention apparaîtront dans la description qui suit
concernant des exemples se référant aux dessins en
annexe dans lesquels :

La figure 1 montre la stimulation de
l'incorporation de thymidine tritiée dans les PBMCs
stimulées ou non par HARP. Barre blanche; cellules non

stimulées ; barre hachurée : cellules stimulées par 100 ng/ml d'HARP.

La figure 2 représente l'effet dose réponse de HARP testé sur les PBMCs. A) Les cellules sont cultivées en absence ou en présence de différentes concentrations allant de 0,1 à 100 ng/ml d'HARP (●-●) ou de Midkine (MK) (O-O). Chacune des valeurs représente la moyenne des cpm obtenus \pm la déviation standard. B) Les cellules sont incubées avec la toxine tétanique (TT) à 1800 UI/ml, la phytohémagglutinine (PHA) à 2,5 μ g/ml, l'interleukine-2 (IL2) à 50 UI/ml, ou non traitées (NT) comme contrôles internes de stimulation.

La figure 3 représente l'effet dose réponse de HARP sur des PBMCs traitées par un anti CD3. Les cellules sont cultivées comme il a été décrit précédemment. Il est à noter que si l'on traite les cellules avec 100 ng/ml de HARP en présence de CD3 une forte mortalité cellulaire est alors observée. Barre noire; HARP seul, barre blanche; HARP + anti CD3.

La figure 4 représente l'effet dose réponse de HARP sur des PBMCs traités par la toxine tétanique. Les cellules sont cultivées comme il a été décrit précédemment. Il est à noter que si l'on traite les cellules avec 100 ng/ml de HARP en présence de toxine tétanique (800 UI/ml) une forte mortalité cellulaire est alors observée. Barre hachurée : HARP seul; barre blanche : HARP + toxine tétanique.

La figure 5 représente l'effet de la protéine HARP sur la réplication du virus HIV par mesure de l'immuno-réactivité p24. Des PBMCs issues d'un patient infecté par HIV sont incubées suivant le protocole décrit dans le §1 pendant 3 jours avec des concentrations variables de HARP (0,1-100 ng/ml). La

réplication virale est estimée par mesure de l'immunoréactivité associée à la protéine p24 présente dans le milieu de culture. (*) faible mortalité cellulaire; (**) forte mortalité cellulaire. La production du virus est évaluée par le test "Abott HIV Ag monoclonal" qui est un dosage immunoenzymatique sur phase solide de type sandwich. Les virus présents dans l'échantillon à tester sont lysés par du Triton X100 puis le lysat est incubé avec des billes en polystyrène recouvertes d'anticorps monoclonal anti-p24. Après incubation, les billes sont lavées, et la présence d'immunoglobulines spécifiques est révélée par incubation avec un deuxième anticorps anti-Ig de souris couplé à la peroxydase. La révélation est faite en rajoutant un substrat de la peroxydase; l'ortho-phénylènediamine

La figure 6 représente l'activation des cellules mononucléées du sang périphérique par les peptides HARP. Les PBMCs sont cultivés pendant 7 jours dans du milieu de culture RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal en l'absence ou en présence de 1 ng/ml de la protéine HARP ou de 1 µg/ml des peptides 1 ou 2. L'incorporation de thymidine tritiée est déterminée comme décrit précédemment.

La figure 7 représente l'étude de l'effet de HARP sur l'expression d'IL1 après 3 jours (barres blanches) ou 7 jours de culture (barres noires). Le dosage de ces cytokines est réalisé à l'aide d'un test ELISA commercialisé par R&D.

La figure 8 représente l'effet de HARP sur l'expression de TNFα après 3 jours (barres blanches) ou 7 jours de culture (barres noires). Le dosage de ces cytokines est réalisé à l'aide d'un test ELISA commercialisé par R&D.

La figure 9 représente l'effet de HARP sur l'expression d'IL6 après 3 jours (barres blanches) ou 7 jours de culture (barres noires). Le dosage de ces cytokines est réalisé à l'aide d'un test ELISA commercialisé par R&D.

La figure 10 représente l'expression de IL6 par les peptide 1 et 2 correspondant aux parties NH₂ et COOH du polypeptide HARP. Le dosage de ces cytokines est réalisé à l'aide d'un test ELISA commercialisé par R&D après 7 jours d'incubation.

La figure 11 représente l'effet des peptides HARP sur la régénération musculaire. Le muscle soléaire de rat adulte est écrasé, traité ou non par les peptides puis prélevé après 4 jours de régénération :

1 : traité par du PBS (50 µl)

2 : traité par le peptide 1 (50 µl, 1 µg)

3 : traité par le peptide 2 (50 µl, 1 µg)

La figure 12 illustre l'effet angiogénique du peptide 1 testé dans la CAM.

A : traitement avec le peptide 1

B : témoin traité avec du PBS

La figure 13 est une représentation schématique du plasmide utilisé pour produire le peptide correspondant à la partie N terminale (résidus 1 à 14) de HARP.

Exemple 1 : Effet de la protéine HARP sur la prolifération des cellules mononucléées humaines issues de sang périphérique.

Les cellules mononucléées humaines provenant de différents donneurs sains, sont isolées à partir du sang périphérique après centrifugation sur coussin de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) comme il est décrit par le fabricant. Les cellules sont lavées, puis

cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (56°C, 30 min), 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules, ensemencées à 10⁶ cellules par ml dans une boîte de culture à 96 puits à fond rond (Costar), sont cultivées pendant 7 jours en présence ou non de la protéine HARP recombinante humaine produite chez Coli, à la concentration de 100 ng/ml. Dans les dernières 18 heures de culture, 1 µCi de thymidine tritiée est ajouté dans chacun des puits. La radioactivité incorporée dans les noyaux des cellules est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 1.

L'analyse de ces résultats nous indique que le polypeptide HARP est capable de stimuler l'incorporation de thymidine tritiée dans le noyau des PBMCs. Suivant les donneurs, il est à noter que l'index de stimulation, défini comme le rapport de la radioactivité incorporée dans les cellules traitées par HARP sur celui des cellules témoins, non traités par HARP, varie de 2,3 à 51,7 fois (cf résultats de l'expérience N°4 et N°7). Cette diversité de réponse peut suggérer qu'il existe une relation entre la réponse des cellules à HARP et l'état d'activation du système immunitaire de l'individu testé. L'histogramme présenté en insert dans la figure 1 montre que le traitement par 100 ng/ml de HARP induit un accroissement du nombre de cellules de 2,9 fois par rapport au témoin non traité, démontrant que l'incorporation de thymidine observée est bien proportionnelle au nombre de cellules. Ce comptage cellulaire a été effectué avec les cellules utilisées pour l'incorporation de thymidine tritiée de l'expérience N° 7.

La courbe dose réponse de la protéine HARP (0,1 à 500 ng/ml) testée sur les PBMCs est présentée sur la figure 2A.

L'analyse de cette courbe nous indique qu'un effet maximal est obtenu pour une concentration de HARP de 1 ng/ml de milieu de culture induisant une stimulation de l'incorporation de DNA de 4,5 à 7,5 fois par rapport à une culture témoin réalisée sans adjonction de HARP. Il est à noter que l'on peut observer une décroissance de la radioactivité incorporée pour des doses plus élevées de HARP allant de 1 à 500 ng/ml. Aucune stimulation n'est observée en utilisant la protéine Midkine (MK), protéine présentant 50% d'homologie en acides aminés avec HARP, testée dans une gamme de concentration allant de 0,1 à 500 ng/ml. Les contrôles positifs de stimulation ont été réalisés en utilisant de la phytohemagglutinine (PHA) 2,5 µg/ml et la toxine tétanique (TT) 1800 UI/ml (fig. 2B). Aucune stimulation n'est observée après addition d'IL2 montrant une absence d'activation des cellules utilisées pour ces tests.

Exemple 2 : Rôle de la protéine HARP comme co-stimulateur de la réponse immunitaire spécifique.

L'activation des lymphocytes T peut être obtenue via l'activateur du récepteur à l'antigène (TCR) associé au système majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette activation nécessite outre la reconnaissance spécifique TCR-CMH/antigène, l'action de molécules d'adhésion jouant un rôle de coactivation et d'amplification de la réponse. Suivant ces données, nous avons étudié si HARP pouvait amplifier la prolifération cellulaire soit par stimulation du récepteur aux

ivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% érum de veau fœtal inactivé par la chaleur (56°C, 30 , 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml deptomycine. Les cellules, ensemencées à 10⁶ cellules/ml dans une boîte de culture à 96 puits à fond rond (star), sont cultivées pendant 7 jours en présence ou de la protéine HARP recombinante humaine produite par Coli, à la concentration de 100 ng/ml. Dans les dernières 18 heures de culture, 1 µCi de thymidine tritiée est ajouté dans chacun des puits. La radioactivité incorporée dans les noyaux des cellules est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 1.

L'analyse de ces résultats nous indique que le polypeptide HARP est capable de stimuler la incorporation de thymidine tritiée dans le noyau des cellules. Suivant les donneurs, il est à noter que l'index de stimulation, défini comme le rapport de la radioactivité incorporée dans les cellules traitées par HARP sur celui des cellules témoins, non traitées par HARP, varie de 2,3 à 51,7 fois (cf résultats de l'expérience N°4 et N°7). Cette diversité de réponse suggère qu'il existe une relation entre la réponse des cellules à HARP et l'état d'activation du système immunitaire de l'individu testé. L'histogramme présenté dans la figure 1 montre que le traitement par 100 ng/ml de HARP induit un accroissement du nombre de cellules de 2,9 fois par rapport au témoin non traité, montrant que l'incorporation de thymidine observée est proportionnelle au nombre de cellules. Ce comptage radioactif a été effectué avec les cellules utilisées pour l'incorporation de thymidine tritiée de l'expérience N° 7.

lymphocytes T à l'aide d'un anti CD3 ou par un antigène mémoire, la toxine tétanique.

5 a) Effet de la protéine HARP sur la stimulation induite par le récepteur des lymphocytes T.

10 L'activation du récepteur des lymphocytes T est obtenue en traitant des lymphocytes par un anticorps monoclonal anti CD3 (1/100, Immunotech). L'effet de HARP sur la prolifération cellulaire des PBMCs, est testé en ajoutant une concentration optimale de HARP (1 ng/ml, cf exemple 1) en présence ou non d'anti CD3. Les cultures ainsi que la quantification de la thymidine tritiée incorporée sont réalisées comme il est décrit dans l'exemple 1. Les résultats obtenus, sont présentés dans la fig. 3.

15 En absence de HARP, l'anticorps anti CD3 (1/100) stimule, après 7 jours d'incubation avec les cellules, l'incorporation de thymidine tritiée de 25 fois (témoin; 600 ± 60 cpm, anti CD3; 15000 ± 200 cpm). A la dose de 1 ng/ml de HARP et en absence d'anti CD3 on observe pour ce donneur une amplification de 5,8 fois par rapport au témoin (témoin; 600 ± 60 cpm, HARP; 3500 ± 200 cpm). A cette même dose de HARP, une amplification de 33 fois dans la réponse est observée lorsque l'on réalise une costimulation des cellules par HARP/anti CD3 (témoin; 600 ± 60 cpm, HARP/anti CD3; 20000 ± 200 cpm). Ce résultat nous indique que la protéine HARP exerce une activité de costimulation additive des lymphocytes dont le TCR est activé. A des concentrations plus élevées de HARP (10 et 100 ng/ml) et en présence d'anti CD3, une incorporation de thymidine plus faible et très faible est observée.

30 Nous avons observé dans ces cultures une forte mortalité cellulaire qui n'est pas observée quand HARP est utilisé seul à ces mêmes doses. Ces résultats

montrent que HARP a un effet costimulateur dose dépendant de la réponse immunitaire associée aux lymphocytes T.

5 b) Effet de la protéine HARP sur la stimulation induite par un antigène mémoire.

Des cellules PBMCs cultivées dans les conditions décrites dans le §1, sont stimulées par la toxine tétanique (1800 UI/ml, Mérieux) seule ou en association avec la protéine HARP utilisée à une concentration allant de 0,1 à 100 ng/ml. La toxine tétanique va spécifiquement amplifier une sous population de lymphocytes T mémoires.

15 L'adjonction de la toxine tétanique à des PBMCs, stimule, après 7 jours d'incubation, l'incorporation de thymidine tritiée de 71 fois (témoin; 600 \pm 60 cpm, toxine tétanique; 43000 \pm 500 cpm) alors qu'une stimulation de 5,8 fois par rapport au témoin non stimulé est observée lorsque les cellules sont incubées avec HARP à 1 ng/ml (témoin; 600 \pm 60 cpm, HARP; 3500 \pm 200 cpm). Une stimulation de l'incorporation de thymidine tritiée de 108 fois par rapport au témoin est observée lorsque les cellules sont costimulées par HARP à la dose de 1 ng/ml et la toxine tétanique (témoin; 600 \pm 60 cpm, HARP/toxine tétanique; 65000 \pm 700 cpm). Les résultats présentés sur la figure 2 nous montrent une synergie d'action sur la stimulation des PBMCs entre un antigène mémoire et HARP.

30 Exemple 3 : Détermination de la population cellulaire amplifiée après traitement par HARP dans une culture de PBMCs.

35 Les cellules ont été isolées du sang périphérique de sujets normaux, donneurs de sang,

5 prélevé sur tube Vacutainer contenant de l'EDTA. Les cellules mononucléées ont été séparées par gradient de ficoll, comptées et ajustées à 10^6 cellules par ml. Les cellules sont incubées pendant 5 jours à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ en présence de HARP ou d'autres peptides à des concentrations qui sont mentionnées dans chacun des exemples décrits.

10 Le tableau II présente les effets de la molécule HARP testée à une concentration de 1 µg/ml sur la prolifération de cellules lymphoïdes.

Tableau II

Anticorps	Témoin	HARP	Variation
	%	%	(%)
CCD19	2	4	-
CCD2	92	95	-
CCD4	47	68	+45
CCD8	33	22	-
CCD16/56	17	18	-
CCD25	12	47	-
CCD45RA	58	34	-
CCD45RO	30	64	+113
RA/RO	1.9	0.5	-
CCD4+CD45RA+	22	15	-31
CCD4+CD45RO+	21	49	+133
RA/RO	1	0.3	-

15 L'analyse des résultats présentés dans ce test nous indique qu'après traitement d'une culture de PBMCs par HARP, on retrouve un fort enrichissement soit 45% de la population lymphocytaire CD4+. Une forte

augmentation CD45RO est également observée (+113%) correspondant à une augmentation des CD4 à mémoire CD4+/CD45RO+ (+133%). Ces résultats nous indiquent que l'on observe une amplification de lymphocytes CD4+ exprimant le CD45RO caractéristique des lymphocytes T mémoire. Cet exemple illustre le rôle adjuvant de HARP dans la réponse immunitaire notamment par amplification et coactivation de la sous population lymphocytaire CD45RO.

Exemple 4 : Action de la molécule HARP sur des cellules mononucléées issues du sang périphérique provenant d'individus infectés par le VIH.

L'activation des lymphocytes T et des monocytes par les cytokines induit une production et/ou une activation des facteurs nucléaires de la cellule hôte capables de réactiver la transcription virale. Cette réactivation virale induite par IL1 et le TNF α dépend en partie de l'activation du facteur NF-Kb. Au cours de l'infection par le VIH, la sécrétion par les monocytes circulants de cytokines IL1, IL6 et en particulier TNF α qui sont capables d'induire ou d'augmenter la réplication du VIH dans les lymphocytes T/monocytes suggère que ces cytokines peuvent augmenter la progression de la maladie. Les résultats de la figure 5, indiquent que les PBMCs provenant d'un malade sidéen (CD4 < 200/mm³) activés uniquement par la protéine HARP, sont capables de produire du virus VIH mesuré par la production de l'antigène viral p24. Cette production est maximale pour une concentration de HARP de 1 ng/ml. Pour une concentration de 100 ng/ml on observe une mort cellulaire importante. On peut donc par cet exemple, proposer d'une part que HARP peut permettre d'amplifier *in vitro* l'expression de la P24 et être utilisée pour le

typage des souches virales HIV, et d'autre part *in vivo* comme 1) inducteur de la réplication du virus, facilitant ainsi l'action d'agents antiviraux sur des lymphocytes infectés quiescents ou 2) à des doses importantes (correspondantes aux effets observés *in vitro* à 100 ng/ml, induire la mort des cellules T chroniquement activées (voir les exemples précédents illustrés par les fig. 3 et 4)

Exemple 5 : Activation des lymphocytes par des peptides HARP.

Suivant le protocole décrit à l'exemple 1, les inventeurs ont testé la capacité de deux peptides dont les séquences correspondent à la partie NH₂ terminale et COOH terminale de HARP à induire une multiplication cellulaire de PBMCs. Les séquences de ces peptides sont les suivantes :

Peptide 1 : NH₂-AEAGKKEKPEKKVKKSDCGEW-COOH; 21 acides aminés.

Peptide 2 : NH₂-AESKKKKKEGKKQEKMLD-COOH; 18 acides aminés.

Les résultats sont présentés dans la figure 6 et montrent que comparativement à la protéine HARP, le peptide 2 est capable d'induire une réponse d'activation des PBMCs meilleure que HARP, près de deux fois supérieure. Pour des concentrations comparables, le peptide 1 a un effet plus faible, près de moitié moins que HARP, mais nettement supérieur au contrôle (plus de deux fois).

Exemple 6 : Induction de l'expression de TNF α , IL6 et IL1 par des cellules PBMCs traitées par HARP.

Les cellules ont été isolées du sang périphérique de sujets normaux, donneurs de sang, prélevé sur tube Vacutainer contenant de l'EDTA. Les cellules mononucléées ont été séparées par gradient de ficoll, comptées et ajustées à 10^6 cellules par ml. Les cellules sont incubées pendant 3 ou 7 jours à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ en présence de concentration variable HARP allant de 1 à 1000 ng/ml ou de différents peptides qui sont mentionnés dans les légendes des figures.

Les résultats sont représentés sur les figures 7, 8 et 9. L'analyse de ces résultats nous indique que la molécule HARP est capable d'induire d'une façon dose dépendante l'expression des cytokines IL1 β (fig.7), TNF α (fig.8) et IL6 (fig.9).

Cet exemple montre que les peptides 1 et 2 dont la structure est donnée dans l'exemple 5 sont capables de stimuler l'expression d'IL6. Une augmentation de l'expression de ces cytokines est également détectée après adjonction aux cellules des peptides tat ou d'autres molécules (angiogénine, protéine tat; résultat non montré) présentant un domaine protéique homologue. Aucune expression de ces cytokines inflammatoires n'est détectée dans ce système lorsque la molécule HARP est dénaturée ou lorsque les cellules sont traitées avec du LPS.

Exemple 7 Effet des peptides HARP dans la régénération musculaire.

L'effet des peptides 1 et 2, dont la structure est définie dans l'exemple 5, sur la régénération musculaire a été testé suivant le protocole énoncé ci-dessous et suivant la technique décrite dans la publication de Bassaglia et coll (Bassaglia, Y., and

Gautron, J. (1995) ; Fast and slow rat muscle degenerate and regenerate differently after whole crush injury ; J. Muscle Res. Cell Motil. 16, 420-429). Après une anesthésie du rat (rat Wistar de 2 à 3 mois), le muscle soléaire est, après dénervation, soumis à un écrasement à l'aide d'une pince à bout plat. L'échantillon à tester est alors injecté sous un volume de 50 μ l de PBS. Après quatre jours de traitement, les animaux sont sacrifiés, les muscles sont prélevés puis congelés dans l'azote liquide. Des coupes de 8 μ m sont réalisés au cryostat puis colorées en utilisant le trichrome de Masson.

Les résultats sont présentés sur la figure 11. L'analyse de ces coupes indique que le muscle traité par 1 μ g de peptide 1 présente un nombre de cellules mononucléées (fig. 11.2) beaucoup plus important que les muscles traités par le peptide 2 (fig. 11.3) ou injecté seulement par 50 μ l de PBS (fig. 11.1). Cette observation indique que l'injection du peptide 1 dans un muscle écrasé, induit après 4 jours de traitement une augmentation du nombre de cellules mononucléées présentes dans les tubes endomysiaux favorisant la régénération tissulaire.

Exemple 8 : Effet des peptides HARP sur l'angiogénèse.

Le "Chicken allantoic membrane test" (CAM test) a été utilisé dans cette étude pour évaluer *in vivo* l'effet des peptides HARP 1 et 2 sur l'induction d'une angiogénèse. La structure de ces peptides est présentée dans l'exemple 5. La procédure expérimentale est la suivante :

Des œufs de poulet fécondés sont incubés à 37°C pendant 3 jours. Après cette période d'incubation, deux orifices sont pratiqués dans la coquille et 3 à 4

ml d'albumine sont aspirés à la seringue. Les échantillons à tester sont déposés sur des disques de méthyl cellulose de 3 mm de diamètre. Après séchage, chaque disque est déposé au jour 4 dans l'orifice ainsi pratiqué. Après une période allant de 9 à 13 jours, l'observation est effectuée. Chaque point de dosage est réalisé 10 fois et chaque dosage est répété 3 fois. L'ensemble des ces résultats est présenté dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau III

Echantillon	FGF-2 (100 ng)	Témoin	HARP (1,5 µg)	Peptide 1 (1,5 µg)	Peptide 2 (1,5 µg)
Réponse	++++	+/-	++	++	--

L'effet du peptide 1 sur l'induction d'une angiogénèse dans la CAM est illustré dans l'exemple suivant (fig. 12).

Exemple 9 : Expression et dosage de l'activité mitogène du peptide correspondant à la partie N terminale de la molécule HARP (résidu 1 à 14).

Le peptide N terminal (acides aminés 1-14) de l'HARP humain est obtenu par recombinaison dans un système d'expression eucaryote.

Ce peptide est réalisé à partir du cDNA de l'HARP humain sous cloné EcoRI dans le vecteur d'expression eucaryote PcdNA-3 (InvitroGen) par création d'un codon stop au niveau de l'acide aminé numéro 15 (kit mutagénèse dirigée, QuickChange, Stratagene US).

Une représentation schématique du plasmide utilisée est donnée à la figure 13 en annexe.

Après vérification de la mutation générée par séquençage, des cellules eucaryotes (NIH 3T3) sont transfectées avec cette construction (Fungene, Roche, NJ USA). L'expression est suivie par Western blot à partir des milieux de culture conditionnés par les cellules transfectées en utilisant l'anticorps anti N terminale de HARP (résidus 1-15, commercialisé par Santa Cruz, Ca, USA). Les cellules sont cultivées pendant 72 h en présence de butyrate puis le milieu conditionné est récupéré. Après purification du peptide impliquant une chromatographie cationique et une phase réverse (Waters, Symmetry ®, C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm). L'élution de la colonne est réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile. La présence de peptide dans les fractions éluées est suivie par mesure de la densité optique à 220 nm. Le dosage de l'activité mitogène induite par le peptide ainsi purifié est réalisé selon le protocole suivant :

Les cellules utilisées sont des cellules HUVEC (Clonetics) utilisées entre les passages 1 à 5. Chacun des puits d'une boîte de culture de 48 puits (Costar) sont incubés pendant 1 nuit à 4°C avec une solution d'HARP (100 ng/ml), de peptide HARP purifié (100 ng/ml) ou seulement du tampon en contrôle négatif. Après rinçage des puits par une solution de PBS, les cellules sont ensemencées à raison de 2×10^4 cellules par cm^2 dans du milieu de culture DMEM contenant 2% de serum de vœu fœtal. Chaque dosage est réalisé en triplicate.

L'induction de la prolifération cellulaire est estimée par comptage des cellules après 72 heures de culture.

Les résultats sont présentés dans le tableau IVci-dessous et indiquent que le peptide HARP

correspondant à la partie N terminale de HARP et produit par génie génétique induit la prolifération cellulaire des cellules endothéliales.

Tableau IV

5

Echantillon testé	Nombre de cellules
HARP	129000 ± 26000
Contrôle	30000 ± 8100
Peptide HARP	12000 ± 14000

10

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. Bohlen P and Kovesdi I. 1991. HBNF and MK, members of a novel gene family of heparin-binding proteins with potential roles in embryogenesis and brain function. *Prog. Growth Factor Res.* 3: 143.
2. Laaroubi K, Vacherot F, Delbe J, Caruelle D, Barritault D and Courty J. 1995. Biochemical and mitogenic properties of the heparin-binding growth factor HARP. *Prog. Growth Factor Res.* 6:25.
3. Rauvala H. 1989. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J.* 8:2933.
4. Merenmies J and Rauvala H. 1990. Molecular cloning of the 18-kDa growth associated protein of developing brain. *J. Biol. Chem.* 265:16721.
5. Hampton B S, Marshak D R and Burgess W H. 1992. Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule. *Mol. Biol. Cell.* 3:85.
6. Milner P G, Li Y S, Hoffman R M, Kodner C M, Siegel N R and Deuel T F. 1989. A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1096.
7. Neame P J, Young C N, Brock C W, Treep J T, Ganey T M, Sasse J and Rosenberg L C. 1993. Pleiotrophin is an abundant protein in dissociative

extracts of bovine fetal epiphyseal cartilage and nasal cartilage from newborns. J. Orthop. Res. 11 :479.

5 8. Gieffers C, Engelhardt W, Brenzel G, Matsuishi T and Frey J. 1993. Receptor binding of osteoblast-specific factor I (OSF-I/HB-GAM) to human osteosarcoma cells promotes cell attachment. Eur. J. Cell. Biol. 62:352.

10 9. Fang W, Hartmann N, Chow D T, Riegel A T and Wellstein A. 1992. Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. J. Biol. Chem. 267:25889.

15 10. Szabat E and Rauvala H. 1996. Role of HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) in proliferation arrest in cells of the developing rat limb and its expression in the differentiating neuromuscular system. Dev. Biol. 178:77

20 11. Wellstein A et al. 1992. A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. J. Biol. Chem. 267:2582.

25 12. Laaroubi K, Delbe J, Vacherot F, Desgranges P, Tardieu M, Jaye M, Barritault D and Courty J. 1994. Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affin regulatory peptide. Growth Factors 10:89.

30 13. Peng H B, Ali A A, Dai Z, Daggett D F, Raulo E and Rauvala H. 1995. The role of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in the postsynaptic induction in cultured muscle cells. J. Neurosci. 15:3027

35

14. Mitsiadis T A, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, Jalkanen M and Thesleff I. 1995. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. Development 121:37.

15. Vandervinden J M, Mailleux P, Schiffmann S N and Vanderhaeghen J J. 1992. mRNA in developing Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB-GAM) and adult rat tissues. Anat. Embryol. 186:387.

16. Ledoux D, Caruelle D, Sabourin C, Liu J, Crepin M, Barritault D and Courty J. 1997. Cellular distribution of the angiogenic factor heparin affinity regulatory peptide (HARP) mRNA and protein in the human mammary gland. J. Histochem. Cytochem. 45:1.

17. Seddon AP, Hulnes JD, Decker MM, Kovessi I, Fairhurst JL, Backer J, Dougher-Vermazen M and Bohlen P. 1994. Refolding and characterization of human recombinant heparin-binding neurite-promoting factor. Protein expr. Purif. 5:14

18. Smith P et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem 150:543

19. Nvotny WF, Maffi T, Mehta RL and Milner PG. 1993. Identification of novel heparin-releasable proteins, as well as the cytokines midkine and pleiotrophin, in human postheparin plasma. Arterioscler. Thromb. 13:1798

20. Kuo MD, Huang SS and Huang JS. 1992. Characterization of heparin-binding growth-associated factor receptor on NIH 3T3 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182:188

21. Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R and Rauvala H. 1994. Isolation of a neuronal cell surface receptor pf heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). J.Biol.Chem. 269:12999

22. Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H and Noda M. 1996. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). J.Biol.Chem. 271:21446

23. Kretschmer PJ, Fairhurst JL, decker MM, Chan CP, Gluzman Y, Bohlen P and Kovesdi I. 1991. Cloning, characterization and developmental regulation of two members of a novel human gene family of neurite outgrowth-promoting proteins; Growth factors 5:99

24. Ratovitski E and burrow CR. 1997. Midkine stimulates Wilms' tumor cell proliferation via signaling receptor. Cell.Mol.Biol. 43:425

25. Ratovitski E, Kotzbauer T, Milbrandt J, Lowenstein CJ and Burrow CR. 1998. Midkine induces tumor cell proliferation and binds to a high affinity signaling receptor associated with JAK tyrosine kinases. J.Biol.Chem. 273:3654

REVENDICATIONS

1) Peptide répondant à la formule (I) :

$(A)_n - A1 - A1 - A2 - A1 - A3 - A4 - A1 - (A)_m$

5 dans laquelle :

. A est un acide aminé quelconque,

. n et m sont chacun des nombres entiers de 0 à 20 dont la somme $n + m$ est comprise entre 0 et 20, de préférence entre 0 et 15 et tout préférentiellement
10 entre 0 et 10,

. A1 est un acide aminé basique et plus particulièrement la lysine (Lys) ou l'arginine (Arg),

. A2 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), l'acide aspartique (Asp),
15

. A3 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, la proline (Pro), l'acide glutamique (Glu), la glutamine (Gln),

. A4 est un acide aminé choisi parmi : les acides aminés basiques, l'acide glutamique (Glu), la glycine (Gly), la sérine (Ser), la valine (Val).
20

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des formules
25 suivantes :

(II) $(A)_n - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Glu} - \text{Lys} - \text{Pro} - \text{Glu} - \text{Lys} - (A)_m$

(III) $(A)_n - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{Arg} - \text{Arg} - \text{Arg} - \text{Arg} - (A)_m$

(IV) $(A)_n - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{Lys} - (A)_m$
30

(V) $(A)_n - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Glu} - \text{Gly} - \text{Lys} - (A)_m$

(VI) $(A)_n - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Ser} - \text{Arg} - (A)_m$
35

(VII) (A)_n - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg -
(A)_m

(VIII) (A)_n - Lys - Lys - Asp - Lys - Val - Lys - Lys -
(A)_m

5 dans lesquelles A, n et m ont la même
signification que dans la formule (I).

10 3) Composition notamment pharmaceutique
contenant un ou plusieurs des peptides selon l'une des
revendications 1 ou 2, associés dans ladite composition
avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 4) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides
selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement
un autre composé, associés dans ladite composition avec
un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour
favoriser la régénération et la croissance cellulaire,
comme la croissance musculaire.

20 5) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides
selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement
un autre composé, associés dans ladite composition avec
25 un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour
favoriser la cicatrisation.

30 6) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides
selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement
un autre composé, associés dans ladite composition avec
un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour
prévenir ou traiter l'ischémie vasculaire.

35 7) Composition pharmaceutique caractérisée
en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides

selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre composé, associés dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour stimuler la prolifération des cellules mononucléées du sang, et tout particulièrement des Lymphocytes T.

8) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre composé, associés dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour stimuler la production des cytokines de l'inflammation.

9) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre composé, associés dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour la prévention ou le traitement des maladies liées à l'immunodépression.

10) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre composé, associés dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, utile pour favoriser la réplication et la libération des virus HIV *in vivo* et permettre ainsi une meilleure accessibilité aux agents antiviraux.

11) Composition caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs des peptides selon l'une des revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre composé, associés dans ladite composition avec un véhicule acceptable, utile pour favoriser la croissance

et la différenciation de cellules en culture, notamment de cellules lymphoïdes comme des lymphocytes T ou des cellules endothéliales.

- 5 12) Composition caractérisée en ce qu'elle
contient un ou plusieurs des peptides selon l'une des
revendications 1 ou 2, et éventuellement un autre
composé, associés dans ladite composition avec un
véhicule acceptable, utile pour amplifier *in vitro* la
10 réplication du virus HIV et ainsi favoriser sa détection
et son typage.

1/6

Fig.1

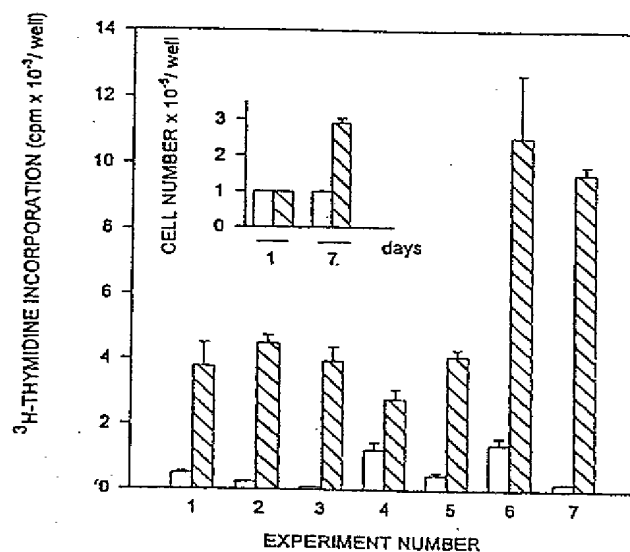


Fig.2

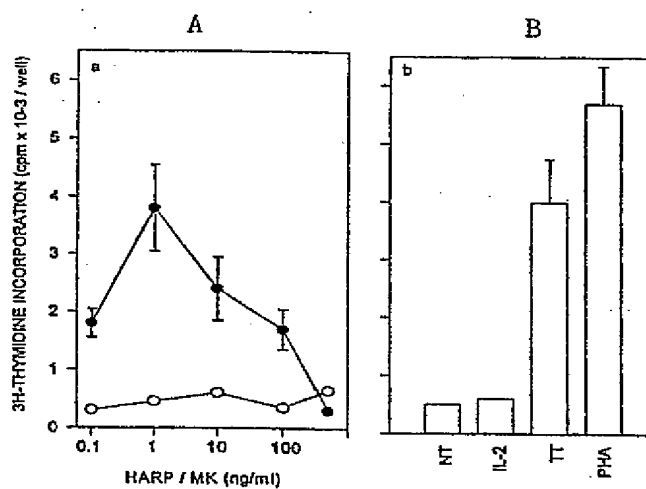
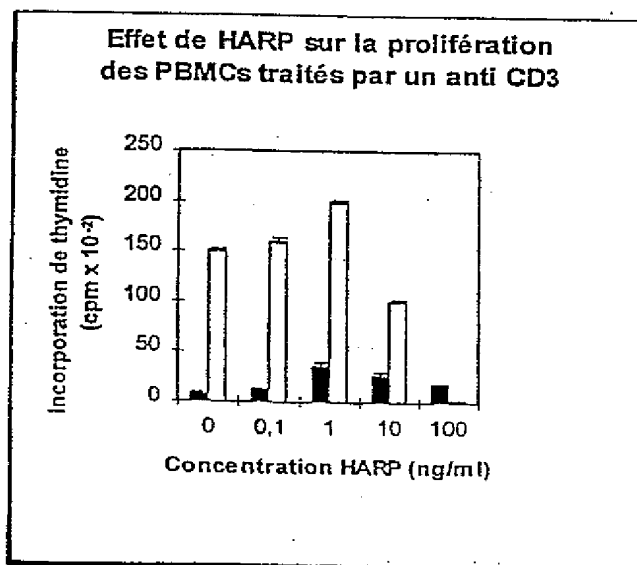


Fig.3



2/6

Fig.4

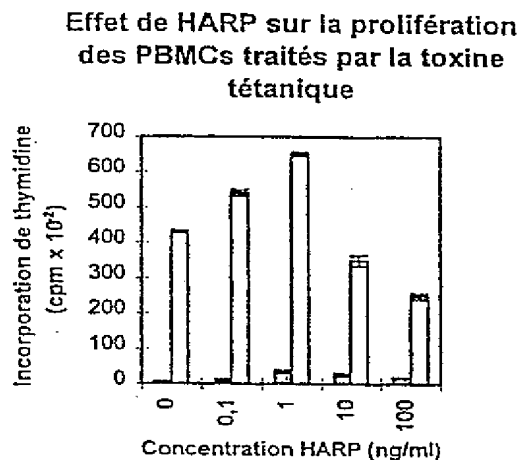


Fig.5

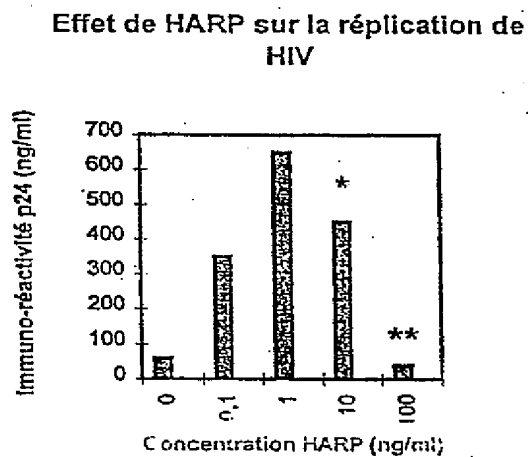
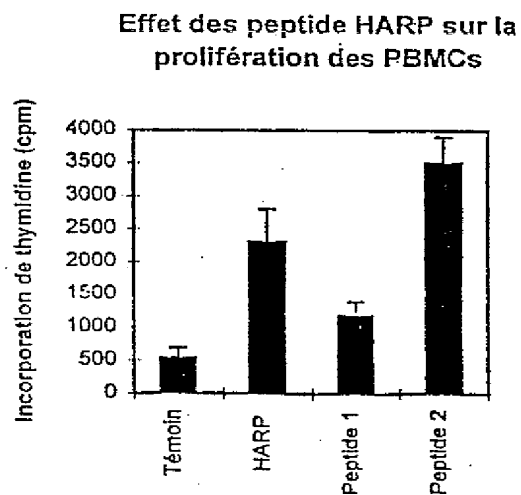


Fig.6



3/6

Fig.7

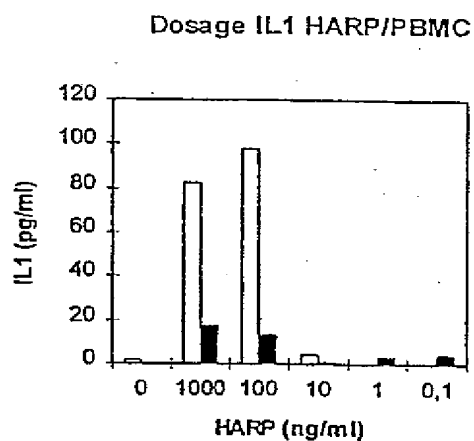


Fig.8

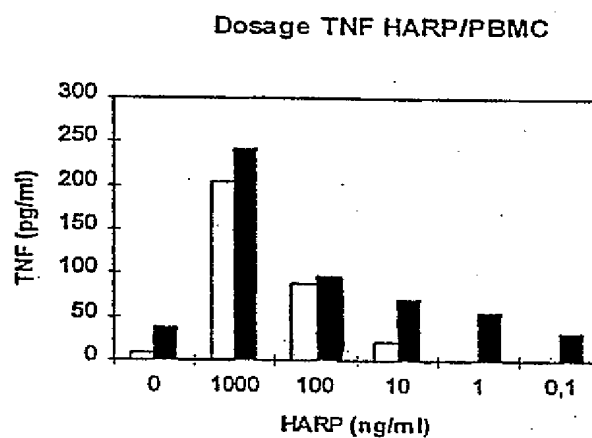
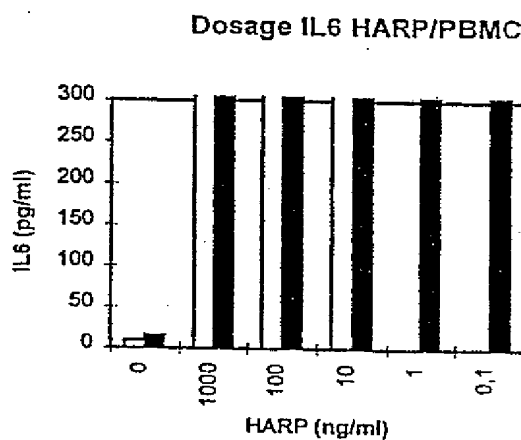


Fig.9



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/6

Fig.10

Induction d'IL6 sur PBMC

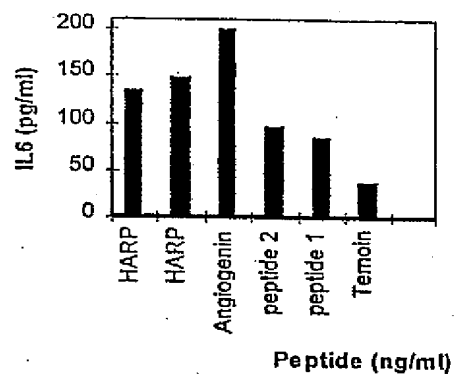




Figure 11.3

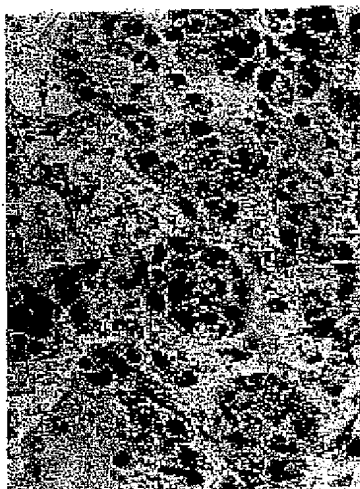


Figure 11.2



Figure 11.1

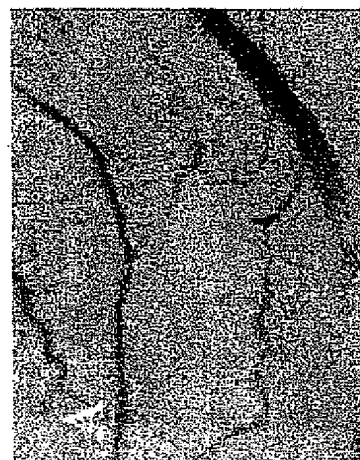
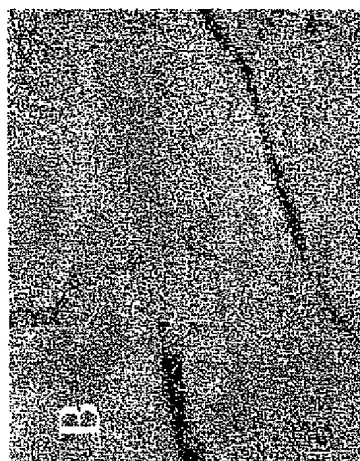


Figure 12

Fig. 13

Nucléotides 1 à 138 du cDNA de l'HARP

